

18. 静岡県に生息するマダニにおける

重症熱性血小板減少症候群ウイルスの保有に関する研究

○池ヶ谷 朝香（静岡県環境衛生科学研究所）
佐原 啓二（静岡県環境衛生科学研究所）
川森 文彦（静岡県環境衛生科学研究所）

【研究目的】

2013年1月、日本国内で初めて重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の患者が報告されて以降、西日本を中心に15県で症例の報告が相次いでいる^{1,2)}。本感染症はSFTSウイルスにより引き起こされる疾患で、特異的な治療法やワクチンがないため死亡例も高率に確認されている。

近年、キャンプやハイキング等のアウトドア活動が盛んになりマダニに接触する機会が増えていることから、マダニ媒介性であるSFTSの発生が危惧されている。マダニからのSFTSウイルス検出に関して、海外においては中国と韓国のフタトゲチマダニやオウシマダニからの検出報告がある^{3,4,5)}。一方、日本国内においては国立感染症研究所の調査により、静岡県を含む23道府県で採取された複数のマダニ種（タカサゴキララマダニ、フタトゲチマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ等）の5～15%がSFTSウイルスを保有していることが報告されている^{6,7)}。静岡県でもこれらの種類のマダニはこれまでに多数採取されている⁸⁾。

現在、静岡県でのSFTS患者発生の報告はないものの、このような背景から県内でもSFTSウイルスに感染する可能性が十分あると思われる。したがって、県内に生息するマダニを採取し地域や種類ごとにSFTSウイルスの保有状況を調査することで静岡県内のSFTSウイルスの浸淫状況を把握することは、本感染症の予防対策において重要であると考えられる。

【研究方法】

1) マダニの採取および分類

2013年5月～2014年6月の春～初夏に、静岡県内48ヵ所（東部19、中部12、西部17）において白布に植生上のマダニを付着させる旗ふり法によりマダニを採取した。採取したマダニは実体顕微鏡下で種類、性別および成ダニ、若ダニ、幼ダニの成長段階ごとに分類し冷凍保存（-80℃）した。

2) SFTSウイルス遺伝子の検出

2013年度は、同一場所で採取した同種同性マダニ1～数匹を1検体としRNAを抽出した。マダニをPBS(-)が入った微生物破砕用ビーズで破砕後、遠心して得られた上清をQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った。この抽出液について、国立感染症研究所より提供された「SFTSV Standard Operating Procedure/OneStep real-time RT-PCR (SOPver2.1)」に従いOne Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (タ

カラバイオ)を使用し、SFTS ウイルスの S セグメントを標識とする MGB プローブを用いた real-time PCR 法により SFTS ウイルスの検出を試みた。また、一部の検体については Super Script®III OneStep RT-PCR System with Platinum®Taq (Invitrogen) を使用した RT-PCR 法を併用した。

2014 年度は、改訂された「マダニからの SFTS ウイルス検出マニュアル (SOPver.3.1)」⁹⁾ に従い、成ダニは 1 匹を 1 検体、若ダニと幼ダニは 5 匹前後を 1 検体として RNA を抽出した。マダニを ISOGEN II (ニッポンジーン) が入った微生物破砕用ビーズで破砕後、遠心して得られた上清に p-Bromoanisole (和光純薬工業) を添加した。これを遠心した上清についてエタノール沈殿処理を行い、抽出した RNA を RNA-direct™ Realtime PCR Master Mix (TOYOBO) を用いて real-time PCR 法を実施した。

【結果】

1) マダニの採取結果

採取されたマダニは 4 属 13 種 2,658 匹であった。最も多く採取されたのはキチマダニ *Haemaphysalis flava* 1,067 匹 (40.1%) であり、次いでフタトゲチマダニ *H. longicornis* が 882 匹 (33.2%)、ヒゲナガチマダニ *H. kitaokai* が 221 匹 (8.3%)、タカサゴキララマダニ *Amblyomma testudinarium* が 112 匹 (4.2%)、オオトゲチマダニ *H. megaspinosa* が 104 匹 (4.0%) であった (表 1)。なお、これら 5 種類のマダニは、いずれも国立感染症研究所の調査で SFTS ウイルスの保有が確認されている。

採取割合を地域別に見ると、東部地域では最も採取数の多かったマダニはフタトゲチマダニ 56.5% であり、次いでヒゲナガチマダニ 13.9% であったのに対し、中部地域および西部地域ではキチマダニがそれぞれ 66.7% および 64.0% で最も採取数が多く、フタトゲチマダニはそれぞれ 15.4% および 9.5% であった。また、タカサゴキララマダニの採取割合は中部地域が 6.2% と 3 地域の中で最も高く、次いで西部地域が 3.9%、東部地域が 3.7% であった (表 1)。

2) SFTS ウイルス遺伝子の検出

採取したマダニ 2,658 匹のうち、SFTS ウイルス検出の報告があるマダニを中心に 1,712 匹 605 検体について遺伝子検査を行った。SFTS ウイルス検出が疑われた検体については精査を試みたが、SFTS ウイルス遺伝子が陽性の検体は確認されなかった (表 2)。

【考察と今後の課題】

本研究において採取されたマダニには、日本で SFTS ウイルス検出報告のあるマダニのうち、キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヒゲナガチマダニ、オオトゲチマダニ、タカサゴキララマダニの 5 種類のマダニが含まれていた。これら 5 種の採取割合は中部地域 (97.7%) と東部地域 (93.8%) では 9 割以上を占めており、西部地域は 80.1% と他の 2 地域に比べやや低率であった。これらのマダニのうち、少なくともフタトゲチマダニとタカサゴキララマダニは、日本における SFTS ウイルスの媒介種と推定されている⁴⁾。3 地域ともタカサゴキララマダニの採取数は少なかつたも

の、フタトゲチマダニは東部地域で採取されたマダニの 5 割以上を占めており、中部地域 (15.4%) や西部地域 (9.5%) とは異なる生息分布が示唆された。

今回、マダニから SFTS ウイルスは検出されなかったが、採取マダニの 8 割以上が SFTS ウイルス検出報告のある種類であったことから、今後、静岡県での SFTS 患者の発生の可能性はあるものと思われる。国立感染症研究所の調査では静岡県のマダニから SFTS ウイルスが検出されていることから、本研究で SFTS ウイルスが検出されなかった原因について、マダニの採取場所や採取時期、採取後のマダニの保管方法、検査手順等を中心に再考する必要がある。特にマダニの採取場所の選定については、地域により分布状況が異なることから十分な検討が必要と思われる。

日本での SFTS ウイルスの存在が明らかになってからまだ 1 年余りであり、ウイルスの全国的な分布状況や媒介するマダニの種類等、十分に解明されていない部分も多い。今後、SFTS 患者が静岡県で発生した場合に、迅速な疫学対応ができるようこれからも継続してマダニの調査を行い、静岡県内の SFTS ウイルスの分布状況や季節的推移等を明らかにしていきたい。

【参考文献】

- 1) 西條政幸ら: 国内で初めて診断された重症 熱性血小板減少症候群患者. 病原微生物検出情報 (国立感染症疫学センター), 34, 40-41 (2013).
- 2) 国立感染症研究所: 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) とは
<http://www.nih.go.jp/niid/ja/sfts/3143-sfts.html>
- 3) Yu XJ, *et al.*: Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. *N Engl J Med*, 364, 1523-1532 (2011).
- 4) Li S, *et al.*: Sporadic case infected by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus in a non-epidemic region of China. *Biosci Trends*, 5, 273-276 (2011).
- 5) Kye-Hyung Kim *et al.*: Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, South Korea, 2012. *Emerg Infect Dis*, 19 (11), 1892-1894 (2013).
- 6) 森川茂ら: 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の国内分布調査結果 (第一報). 病原微生物検出情報 (国立感染症疫学センター), 34, 303-304 (2013).
- 7) 森川茂ら: 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の国内分布調査結果 (第二報). 病原微生物検出情報 (国立感染症疫学センター), 35, 75-76 (2014).
- 8) 川森文彦ら: 静岡県中西部におけるマダニの分布状況ならびに紅斑熱群リケッチア浸淫状況. 静岡県環境衛生科学研究所報告, 53, 41-44 (2010).
- 9) 国立感染症研究所獣医科学部第三室: マダニからの SFTS ウイルス検出マニュアル
<http://www0.nih.go.jp/~auda/tick-SFTS-manual.pdf>

表1 マダニの採取状況

| マダニの種類 | 各地域で採取されたマダニ数 (%) | | | 合計 (%) |
|------------|-------------------|-----------|-----------|-------------|
| | 東部 | 中部 | 西部 | |
| キチマダニ | 175(13.6) | 313(66.7) | 579(64.0) | 1,067(40.2) |
| フタトゲチマダニ | 725(56.4) | 72(15.4) | 86(9.5) | 883(33.2) |
| ヒゲナガチマダニ | 178(13.9) | 33(7.0) | 10(1.1) | 221(8.3) |
| オオトゲチマダニ | 78(6.1) | 11(2.4) | 15(1.7) | 104(3.9) |
| タカサゴチマダニ | 26(2.0) | 0 | 2(0.2) | 28(1.1) |
| ヤマアラシチマダニ | 11(0.9) | 0 | 31(3.4) | 42(1.6) |
| ヤマトマダニ | 27(2.1) | 10(2.1) | 64(7.0) | 101(3.8) |
| シュルツェマダニ | 0 | 0 | 57(6.3) | 57(2.1) |
| アカコッコマダニ | 15(1.2) | 1(0.2) | 16(1.8) | 32(1.2) |
| タネガタマダニ | 0 | 0 | 6(0.7) | 6(0.2) |
| ヒトツトゲマダニ | 1(0.1) | 0 | 2(0.2) | 3(0.1) |
| タカサゴキララマダニ | 48(3.7) | 29(6.2) | 35(3.9) | 112(4.2) |
| タイワンカクマダニ | 0 | 0 | 2(0.2) | 2(0.1) |
| 合計 | 1,284 | 469 | 905 | 2,658 |

表2 SFTSウイルス検出結果

| マダニの種類 | 成ダニ♀ | 成ダニ♂ | 若ダニ | 幼ダニ | 合計 |
|------------|-----------|-----------|-----------|---------|------------|
| キチマダニ | 0/ 84/156 | 0/ 59/104 | 0/ 64/329 | NT | 0/207/ 589 |
| フタトゲチマダニ | 0/ 19/ 54 | 0/ 15/ 37 | 0/ 68/412 | NT | 0/102/ 503 |
| ヒゲナガチマダニ | 0/ 95/145 | 0/ 42/ 71 | NT | NT | 0/137/ 216 |
| オオトゲチマダニ | 0/ 4/ 12 | 0/ 5/ 8 | 0/ 18/ 69 | 0/ 1/ 6 | 0/ 28/ 95 |
| タカサゴチマダニ | 0/ 1/ 1 | NT | 0/ 2/ 7 | NT | 0/ 3/ 8 |
| ヤマアラシチマダニ | 0/ 11/ 15 | 0/ 8/ 14 | 0/ 2/ 3 | NT | 0/ 21/ 32 |
| ヤマトマダニ | 0/ 35/ 47 | 0/ 29/ 44 | NT | NT | 0/ 64/ 91 |
| シュルツェマダニ | 0/ 1/ 2 | 0/ 1/ 2 | 0/ 4/ 53 | NT | 0/ 6/ 57 |
| アカコッコマダニ | 0/ 1/ 1 | NT | 0/ 9/ 28 | NT | 0/ 10/ 29 |
| タネガタマダニ | NT | NT | 0/ 2/ 6 | NT | 0/ 2/ 6 |
| ヒトツトゲマダニ | 0/ 1/ 1 | 0/ 2/ 2 | NT | NT | 0/ 3/ 3 |
| タカサゴキララマダニ | 0/ 1/ 1 | 0/ 1/ 1 | 0/ 18/ 79 | NT | 0/ 20/ 81 |
| タイワンカクマダニ | NT | 0/ 2/ 2 | NT | NT | 0/ 2/ 2 |
| 合計 | 0/253/435 | 0/164/285 | 0/187/986 | 0/ 1/ 6 | 0/605/1712 |

NT:検査せず SFTS陽性数/検体数/検査匹数

【経費使途明細】

| 品目 | 金額(円) |
|---|---------|
| 1.5ml マイクロチューブ | 7,935 |
| 破砕用イージービーズ | 154,560 |
| RNA抽出用試薬 (ISOGEN II、p-ブロモアニソール、 エタ沈メイト、2-プロパノール) | 84,650 |
| 遺伝子増幅試薬 | 232,302 |
| 遺伝子解析受託 | 20,580 |
| 合計 | 500,027 |